# RTS094
# Mycoplasma pn. Q – PCR Alert Kit

Instruções de Uso

## USO PRETENDIDO

O produto **MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert AmpliPROBE** é parte de um ensaio quantitativo de amplificação de ácidos nucleicos para detecção de DNA de *Mycoplasma pneumoniae* (*M.* pneumoniae) em amostras de DNA extraídas de saliva, lavagem broncoalveolar (BAL) e aspirado broncotraqueal.

O produto deve ser usado, com dados clínicos e outros testes laboratoriais, na diagnose e monitoramento de infecções de *M. pneumoniae*.

O produto fornece a mistura de sondas fluorescentes AmpliPROBE para amplificação em tempo real em uma solução estabilizada, pré-dosada em alíquotas em quatro tubos teste descartáveis. Cada tubo teste contém 110µL de solução, suficiente para 24 reações.

A sonda *M peneumoniae*, marcada com o fluoróforo FAM e bloqueada pelo grupo MGB-NFQ, é específica para a região do gene que codifica citoadesão P1 de *M. pneumoniae*.

A sonda para adequação do teste interno da amostra, marcada com o fluoróforo VIC e bloqueada pelo grupo MGB-NFQ, é específico para a região promotora e 5' UTR do gene da betaglobina humana.

O procedimento envolve uma reação de amplificação em tempo real em um termociclador para tempo real.

A padronização do sistema foi realizada na Applied Biosystems ABI PRISM™ 7000 series instruments.

O produto fornece 96 determinações, incluindo padrões e controles.

## PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

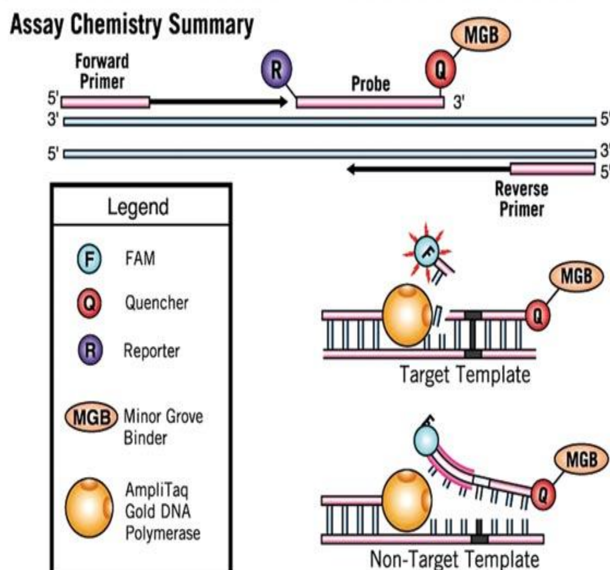
O procedimento envolve uma reação de amplificação em Tempo Real em microplaca em um equipamento com termostato programável fornecido com sistema óptico de detecção fluorescente (RT-PCR = termociclador em tempo real).

Em cada poço, uma reação de amplificação é realizada para uma região do gene que codifica P1 de citoadesão de *M. pneumoniae* e para a região do gene de betaglobina humana (teste de adequação interna da amostra) usando o DNA extraído da amostra a ser testada. Uma sonda específica para *M. pneumoniae* marcada com o fluoróforo FAM é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação *M. pneumoniae*.

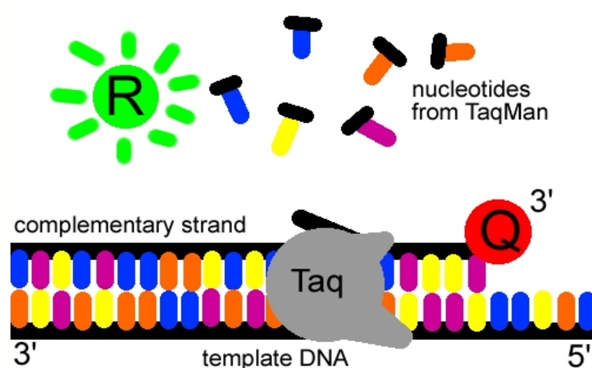
Outra sonda específica para o gene da beta globina marcada com o fluoróforo VIC é ativado quando hibridizado com o produto da reação

de amplificação para o gene da beta globina humana. A emissão de fluorescência aumenta à medida que os produtos específicos da reação de amplificação aumentam e é medida e gravada no equipamento. O processamento dos dados determina a presença e a titulação do DNA de *M. pneumoniae* na amostra inicial.

A partir do momento que a sonda TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers anelam-se ao DNA.




A TaqPolimerase então adiciona nucleotídeos e remove a sonda TaqMan**®** do DNA gabarito. Isso separa o quencher do reporter, e permite o reporter emitir sua energia. Isso é então quantificado usando um computador. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, mais oportunidades a TaqMan® terá de se ligar, e em contra partida, mais luz emitida será detectada.




O corante do reporter é liberado da dupla-fita de DNA criada pela Taq Polimerase. Longe do corante quencher, a luz emitida do corante reporter dye em estado excitado pode agora ser observada.

A padronização do sistema foi realizada nos instrumentos da Applied Biosystems ABI PRISM série 7000.

## COMPONENTES FORNECIDOS

| Componente | Descrição | Quantidade | Composição |
|---|---|---|---|
| **Mycoplasma Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS094-M** | Mistura de primers de oligonucleotídeos | 4 x 110 µL | Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100 |
| **Mycoplasma Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS094-P** | Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM / MGB-NFQ e com VIC / MGB-NFQ | 4 x 110 µL | Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100 |
| **Q-PCR Alert AmpliMASTER - RTS000** | Mistura de reagentes optimizados | 4 x 340 µL | TRIS (base e cloridrato), Glicerol, $MgCl_2$, Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase, Taq DNA polimerase hot start |
| | Microplaca com 96 pocinhos de 0,2 ml | 3 | Plástico PP |
| | Lâmina adesiva vedante | 3 | Plástico e cola |

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamentos necessários, mas não fornecidos:
- Capela de fluxo laminar.
- Agitador tipo Vortex.
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipetas simples, volume variável.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo, com microcomputador.

Material de Consumo:
- EPI
- Ponteiras com filtro
- Água ultrapura
- Tubos de microcentrifugação (1,5 mL a 2,0 mL)

Amostras:
- DNA extraído por metodologia definida pelo usuário, seguindo as normas e padrões de amostras exigidos na descrição abaixo.

## CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

| Componente | Referência modelo | Quantidade | Estocagem |
|---|---|---|---|
| Mycoplasma Q-PCR Alert AmpliMIX | RTS094-M | 4 x 110 µL | -20°C |
| Mycoplasma Q-PCR Alert AmpliPROBE | RTS094-P | 4 x 110 µL | -20°C |
| Q-PCR Alert AmpliMASTER | RTS000 | 4 x 340 µL | + 2° / +8°C |
| Microplaca para amplificação | | 3 | Temp. Ambiente |
| Lâmina adesiva para amplificação | | 3 | Temp. Ambiente |

## PRECAUÇÕES

Este kit é reservado para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro*.

**Manuseio:** é necessário, ao manusear o kit e as amostras com EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra – material biológico humano. Tratar como potencialmente infecciosos por ser a amostra de origem humana.

Não beba ou coma na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser ambiente limpo e com ventilação adequada. Deve se trabalhar dentro de capela de exaustão / fluxo laminar.

Não manuseie o kit sem luvas.

### Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais usados como se fossem agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas. Evitar a formação de aerosol durante o procedimento – evite respingar material ao redor da área de trabalho ou fora dela. O material que está em contato com as amostras biológicas deve ser tratado com Hipoclorito de sódio a 3 % pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121°C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável combustível deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contêm ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Não pipetar nenhuma solução com a boca.

Lavar bem as mãos depois de haver manipulado as amostras e os reagentes.

Eliminar reagentes e resíduos conforme as normas vigentes.

Ler todas as instruções fornecidas no kit antes de realizar o teste.

Respeitar às instruções fornecidas no kit durante a execução do teste.

Respeitar a data de validade do kit.

Utilizar somente os reagentes presentes no kit e aqueles aconselhados pelo fabricante.

Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

## Advertências e precauções para a biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para evitar o risco de resultados incorretos, em particular por causa da degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou da contaminação das amostras por parte de produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular.

As amostras devem ser destinadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente para aquela área de trabalho. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

## Advertências e precauções específicas para os componentes

Os tubos teste contendo AmpliPROBE são descartáveis e sendo assim, devem ser usados apenas uma vez na preparação da mistura de reação.

A AmpliPROBE possui os seguintes avisos de segurança (S):

**S 23-25** Não aspire gás/fumaça/vapor/spray. Evite o contato com os olhos.

## CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

Este produto deve ser usado com DNA extraído das seguintes amostras biológicas: lavado broncoalveolar (BAL) e aspirado broncotraqueal (BA).

As amostras de lavado broncoalveolar e aspirado broncotraqueal que serão usadas para extração de DNA devem ser colhidas de acordo com as direções do laboratório, em solução fisiológica estéril, transportadas a +2°C/+8°C e armazenadas a +2°C/+8°C por no máximo três dias.

Não congele lavado broncoalveolar e aspirado broncotraqueal para evitar lise celular e perda na titulação do DNA bacteriano.

Instruções para pré-tratamento das amostras clinicas, se aplicáveis, e para a extração de DNA estão no manual de instrução do EXTRAcell®.

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

O DNA extraído da amostra inicial não deve conter heparina ou hemoglobina para evitar o problema de inibição da amplificação e a possibilidade de frequentes resultados não válidos.

Não há dados disponíveis pertinentes a inibição causada por drogas antivirais, antibióticos, quimioterápicos ou imunossupressores.

As influências pré-analíticas, tais como, anticoagulantes, luminosidade, temperatura ou umidade, bem como outras influências físicas, químicas ou biológicas já foram descritas acima nos demais cuidados com a amostra.

## PROCESSO DE MEDIÇÃO

A preparação da medição, com todas as operações necessárias à utilização correta do produto, incluindo as instruções adequadas para reconstituição, mistura, diluição ou outra forma de preparo dos reagentes de trabalho, bem como citação das especificações do diluente a ser utilizado:

O produto MYCOPLASMA pn. Q-PCR AlertPROBE deve ser usado com os produtos Q-PCR Alert AmpliMASTER e MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert AmpliMIX para obter a mistura de reação.

A AmpliPROBE está pronta para uso, sendo assim deve ser adicionado diretamente à reação de mistura.

O procedimento completo envolve preparação e execução de amplificação em tempo real em uma microplaca com um termociclador em tempo real e é descrito em detalhe no manual de instruções com o MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert AmpliMIX.

As características de desempenho e limitações do procedimento do ensaio completo para detecção e dosagem de DNA *M. pneumoniae* são descritos em detalhes no manual de instruções com o MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert AmpliMIX.

As técnicas de utilização dos reagentes e dos demais componentes do produto, descrevendo os volumes utilizados, os tempos requeridos em cada etapa ou fase, as condições ambientais, bem como os ajustes dos instrumentos de medição do produto, da técnica ou da reação:

**Preparo da etapa de amplificação real time**

(Realizado na área de amplificação/detecção dos produtos da amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- Consultar a documentação do equipamento, ligar o termociclador para tempo real, ligar o computador de controle, iniciar software e abrir a sessão "absolute quantification";
- Consultar a documentação do instrumento, configurar o "detector" para a sonda de *M. pneumoniae* com o "reporter" como "FAM" e o "quencher" como "nenhum" (NFQ= Quencher não fluorescente);
- Consultar a documentação do instrumento, configurar o "detector" para a sonda da betaglobina com o "reporter" como "VIC" e o "quencher" como "nenhum" (NFQ= Quencher não fluorescente);
- Consultar a documentação do instrumento, para cada poço usado na microplaca, configurar os "detectores" (tipo de fluorescência a serem medidas), a "referencia passiva" como "ROX" (normalização da fluorescência medida), e o tipo da reação (amostra, controle negativo de amplificação, controle positivo de amplificação, padrão de quantidade conhecida). Adicione estas informações à planilha adicionada no fim deste manual de instruções ou imprima a organização da microplaca. A planilha deve ser seguida cuidadosamente durante a transferência da reação de mistura e amostras nos poços.

Ilustra-se a seguir, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 11 amostras.

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | A9 | | | | | | | | | | |
| A2 | A10 | | | | | | | | | | |
| A3 | A11 | | | | | | | | | | |
| A4 | CN | | | | | | | | | | |
| A5 | $10^2$ | | | | | | | | | | |
| A6 | $10^3$ | | | | | | | | | | |
| A7 | $10^4$ | | | | | | | | | | |
| A8 | $10^5$ | | | | | | | | | | |

**Legenda: A1 - A14:** Amostras para analisar;
**CN**: Controle negativo de amplificação;
**CP**: Controle positivo da amplificação

- Consultando a documentação do equipamento, programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico e um volume de reação de 25 µL. Para equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000 escolher a opção "9600 emulation".

| Ciclo térmico para amplificação | | |
|---|---|---|
| **Fase** | **Temperaturas** | **Tempos** |
| Descontaminação | 50°C | 2 min. |
| Desnaturação inicial | 95°C | 10 min. |
| 45 ciclos | 95°C | 15 seg. |
| | 60°C | 1 min. |

**Preparação da amplificação**

(Realizado na área de extração/ preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar, é necessário:

- Retirar e descongelar os tubos contendo as amostras a serem analisadas. Centrifugar os tubos para que o material desça para o fundo do tubo e mantê-los em gelo;
- Retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX necessários para o processo lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que os reagentes desçam para o fundo e mantê-los em gelo;
- Retirar e descongelar um número igual de tubos de AmpliPROBE e tubos de AmpliMIX. Repita o pulso nesses tubos para que seu conteúdo desça para o fundo tubo. Mantê-los em gelo.
- Retirar o mesmo numero de tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Escreva "MYCO pn." e a data no tubo com caneta de tinta permanente. Dê um pulso nos tubos para que os reagentes depois de descongelados, desçam para o fundo. Manter em gelo.
- Retirar e descongelar os tubos de controle positivo. Pulsar os tubos para que os reagentes depois de descongelados, desçam para o fundo. Mantenha em gelo.
- Se necessário, corte a placa de amplificação para separar a parte que será utilizada no ensaio tomando o devido cuidado de manipulá-la com luvas sem talco e de não causar danos aos poços.

1. Transferir 100 µL de AmpliMIX no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem e pipetar três vezes o volume de 100 µL na mistura.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE no tubo de AmpliMASTER. Misturar bem e pipetar três vezes o volume de 100 µL na mistura.
3. Misturar em Vortex em baixa velocidade por 5 segundos, evitando formação de espuma.
4. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que todo líquido vá para o fundo.
5. Transferir 20 µL da mistura de reação obtida para o fundo de cada poço na placa de amplificação, conforme estabelecido na planilha.

**NOTA**: Caso não seja utilizada toda a mistura de reação, armazene no escuro a -20°C por no máximo um mês em um tubo rotulado como MYCO. pn. Congele e descongele a mistura de reação somente uma vez.

6. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 µL de DNA extraído, conforme posição definida na planilha elaborada. Prossiga da mesma forma para as demais amostras de DNA extraídas.
7. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo do poço de controle negativo, 5 µL de água ultrapura.
8. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 µL de controle positivo, conforme posição definida na planilha elaborada na mistura de reação.
9. Selar a Microplaca de amplificação com a Lâmina adesiva de amplificação.
10. Transferir a placa de amplificação para o termociclador para tempo real, que deve estar em área específica de amplificação/ detecção e inicie o ciclo de amplificação.

As informações sobre procedimentos adicionais relevantes para executar a medição e o tempo na qual ela pode ser realizada.

Não há outros procedimentos além dos acima mencionados.

## CALIBRAÇÃO DO PROCESSO

Não é o caso, pois não existe procedimento de calibração para a metodologia em questão.

## CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

### Análise qualitativa dos resultados

Os valores de fluorescência emitida pela sonda específica para o *M. pneumoniae* (FAM) e pela sonda específica para o Controle Interno (VIC) na reação de amplificação devem ser analisados pelo software específico.

Antes de analisar, consultar a documentação do instrumento:

- referindo-se à documentação do equipamento, programar manualmente o “baseline” (nível de fundo fluorescente) do ciclo 6 ao ciclo 15*;

**Observação:** No caso de uma amostra positiva, com um alto título de *M. pneumoniae*, a fluorescência FAM da sonda específica para *M. pneumoniae* pode começar a crescer antes do 15° ciclo. Neste caso o intervalo de cálculo da "baseline" deve ser adaptado do ciclo 6 ao ciclo em que a fluorescência FAM começar a aumentar.

- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência FAM para 0,2;
- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência VIC para 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos para a sonda específica para *M. pneumoniae* na reação do controle positivo e os valores de Ct são usados para validar a sessão de trabalho como mostrado na tabela seguinte:

| Ct Controle Positivo *M. pneumoniae* (FAM) | Resultado | Amplificação/Detecção |
|---|---|---|
| Determinado | Positivo | Correto |

Se o Ct do controle positivo é indeterminado, significa que o DNA alvo não foi detectado. Um problema ocorreu durante a fase de amplificação ou detecção (volume das misturas de reação incorreto, degradação da sonda, degradação do controle positivo, dispensação incorreta do controle positivo, configuração incorreta da posição do controle positivo, configuração incorreta do ciclo térmico) que pode ter levado a resultados incorretos. A sessão é inválida e deve ser repetida da fase de amplificação.

Os valores de fluorescência emitidos por uma sonda específica para *M. pneumoniae* na reação de amplificação do controle negativo e o valor de Threshold são usados para validar a amplificação e detecção como mostrado na tabela seguinte:

| Ct Controle Negativo *M. pneumoniae* (FAM) | Resultado | Amplificação/Detecção |
|---|---|---|
| Indeterminado | Negativo | Correto |

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado, a presença do DNA alvo foi detectada. Isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação (contaminação) que podem ter levado a resultados incorretos e falso positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas nas reações de amplificação de cada amostra e o valor Threshold são utilizados para detectar a presença do DNA alvo e para validar a amplificação e a detecção através pela determinação do Ciclo Threshold (Ct), o ciclo no qual o valor Limiar de fluorescência foi alcançado.

Os resultados do Ct para cada amostra são interpretados conforme mostrado na tabela:

| Ct da Amostra | | Adequação da Amostra | Resultado da Análise | *M. pneumoniae* DNA |
|---|---|---|---|---|
| *M. pneumoniae* (FAM) | Controle Interno (VIC) | | | |
| Ct Indeterminado | Ct > 35 ou Ct indeterminado | Não Adequada | Inválida | - |
| | Ct ≤ 35 | Adequada | Válida, Negativa | NÃO DETECTADO |
| Ct Determinado | Ct > 35 ou Ct indeterminado | Adequada* | Válida, Positiva | PRESENTE |
| | Ct ≤ 35 | Adequada | Válida, Positiva | PRESENTE |

Se o resultado da reação de amplificação da amostra **é Ct indeterminado para *M. pneumoniae* e Ct > 35 ou indeterminado para o controle interno**, isto significa que o DNA do Controle Interno não foi detectado de forma eficiente. Neste caso, problemas ocorreram durante a fase de amplificação (amplificação inválida ou ineficiente) ou na fase de extração (ausência de DNA ou presença de inibidores) os quais podem causar resultados falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido começando pela extração de uma nova amostra.

**Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é** Ct indeterminado para *M. pneumoniae* **e** Ct ≤ 35 para o Controle Interno**, isto significa que o DNA *M. pneumoniae* não foi detectado no DNA obtido a partir da amostra, mas não é possível excluir a presença de DNA em título menor que o limite de detecção do produto (verificar Características de Desempenho). Neste caso o resultado seria um falso negativo.**

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados levando em consideração todos os dados clínicos e os outros testes laboratoriais efetuados no paciente.

<u>Obs.:</u> quando DNA *M. pneumoniae* é detectado na reação de amplificação da amostra a amplificação do Controle Interno pode resultar em Ct > 35 ou indeterminado. De fato, a baixa eficiência da reação de amplificação do Controle Interno pode ser ocasionada pela alta eficiência da reação de amplificação do DNA de *M. pneumoniae*. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do teste é válido.

**Cálculo do Limite de Detecção**

Quando um método de extração em particular é usado e se referem a uma unidade de medida em particular, o limite de detecção pode ser calculado a partir do limite de detecção do produto de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Limite de detecção (gEq / extração)} = \frac{\text{Ve x 10 gEq}}{\text{Va x Ve}}$$

- **Ee:** é a eficiência da extração, expressa em décimos; quando utilizado o Extracell é 1,0 (100% de eficiência).
- **Ve:** é o volume total do produto da extração, expresso em µL; quando utilizado Extracell o Ve é 100.
- **Va:** é o volume do produto da extração usado na reação de amplificação, expresso em µL; quando este produto é utilizado o parâmetro é de 5 µL.

Quando o kit Extracell é usado o limite é:

| Kit de extração | Fórmula Simplificada |
|---|---|
| «EXTRAcell®» | Limite de detecção= 200 gEq / extração |

## LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Use somente DNA extraído das seguintes amostras humanas com o produto: lavagem broncoalveolar (BAL), aspirado broncotraqueal (BA).

Não utilizar com este produto o DNA extraído das amostras heparinizadas: a heparina inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não utilizar com este produto DNA extraído contaminado com hemoglobina. Esta substância inibe a reação de amplificação dos ácidos nucleicos podendo causar resultados inválidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenômenos de inibição por parte dos medicamentos antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem da correta coleta, transporte, armazenamento e preparação das amostras; para evitar resultados incorretos, é necessário, portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extração dos ácidos nucleicos.

Devido a sua alta sensibilidade analítica, o método de amplificação em tempo real dos ácidos nucleicos utilizados neste produto está sujeito a contaminação por amostras clínicas positivas para DNA de *M. pneumoniae*, controles positivos e, até mesmo, produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. O produto foi desenvolvido de forma a limitar as contaminações; mesmo assim estes fenômenos podem ser evitados somente com uma boa prática de laboratório e seguindo escrupulosamente as instruções fornecidas nestas instruções.

Este produto requer pessoal instruído no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e preparações químicas classificadas como para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer roupa de trabalho (EPI) e área de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de reagentes classificados como perigosos, para evitar

incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para técnicas de biologia molecular como extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário possuir áreas separadas para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos de amplificação para prevenir resultados falsos positivos.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho (EPI) e instrumentos destinados à extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o DNA de *M. pneumoniae* não foi detectado no DNA extraído da amostra, mas ele pode a amostra pode conter DNA de *M. pneumoniae* a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto (veja capítulo Características de Desempenho), neste caso o resultado será um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou reduzido. Em situações particulares como diagnósticos de urgência, o risco residual pode contribuir a decisões incorretas com consequências graves para o paciente.

## CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação com reação de controle negativo e uma reação de controle positivo.

Para o controle negativo, utilize água bidestilada estéril (não fornecida com o produto) adicionada à reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controle positivo, utilize o produto MYCOPLASMA pn.-Positive Control.

### Controles de Qualidade

É recomendado validar todo o procedimento de análise para cada sessão de extração e amplificação pelo processamento de uma amostra negativa e uma positiva que já foram testadas, ou material de calibração de referência.

## VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

**Sensibilidade Analítica: limite de detecção**

A sensibilidade analítica deste teste permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos de limite de detecção, a sensibilidade analítica do ensaio foi testada usando um DNA plasmídico contendo o produto de amplificação cuja concentração inicial foi medida através de espectrofotômetro. O DNA plasmídico foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5 µL em DNA humano genômico a um título de 500 ng / 5 µL. Esta amostra foi usada em 50 repetições para realizar a amplificação com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| 10 cópias DNA plasmídico + 500ng de DNA genômico humano | 50 | 50 | 0 |

**Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção e quantificação nos diferentes genótipos / subtipos**

A sensibilidade diagnóstica do teste, que é a eficiência de detecção e quantificação nos diversos genótipos /subtipos, está avaliada por comparação de sequências com banco de dados de nucleotídeos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do primer de oligonucleotídeos AmpliMIX e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados do gene que codifica P1 de citoadesão de *M. pneumoniae* mostrou preservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade diagnostica do ensaio, que é a eficiência de detecção de diferentes genótipos/ subtipos, foi avaliada pela análise de algumas amostras que eram positivas para *M. pneumoniae.*

A sensibilidade diagnóstica do ensaio foi testada usando, como material de referência, amostras certificadamente positivas para DNA de *M. pneumoniae* linhagem FH, ATCC 15531 (Vircell SL, Espanha), de *M. pneumoniae* NCTC 010119 (Minerva Biolabs GmbH, Alemanha) e *M. pneumoniae* de uma amostra clínica. Cada amostra foi usada para realizar a amplificação com produtos Nanogen Advanced Diagnostics. Os resultados são mostrados na tabela a seguir:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| *M. pneumoniae* linhagem FH | 1 | 1 | 0 |
| *M. pneumoniae* NCTC 010119 | 1 | 1 | 0 |
| *M. pneumoniae* de amostra clínica | 1 | 1 | 0 |

**Sensibilidade Analítica: marcadores potencialmente interferentes**

Em termos de ausência de reatividade cruzada com interferência de outros marcadores potencialmente interferentes, a especificidade analítica foi avaliada por comparação das sequências com nucleotídeos de base de dados.

O teste de alinhamento das regiões escolhidas para hibridização com oligonucleotídeos primer AMpliMIX e as sondas fluorescentes AmpliPROBE com as sequências disponíveis na base de dados de organismos outros que de *M. pneumoniae,* incluindo o genoma completo de *Chlamydophila pneumoniae* e de *Legionella pneumophila* demonstrou a especificidade e ausência de homologias significativas.

Em termos de ausência de reatividade cruzada com outros marcadores interferentes potenciais, a sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada pela análise de algumas amostras que eram positivas para DNA de *Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila* e *Mycoplasma hominis.*

A sensibilidade analítica do ensaio foi avaliada usando, como material de referência, amostras que eram certificadamente positivas para DNA de *C. pneumoniae* linhagem CM-1, ATCC VR-1360 (vircell SL, Espanha) e DNA de *Legionella pneumophila,* sorogrupo 1, ATCC 33152 (Minerva Biolabs GmbH, Alemanha). Estes microorganismos causam infecções respiratórias e são frequentemente encontrados em amostras clínicas. Cada amostra foi usada para realizar o procedimento completo para análise, extração e amplificação com os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.Os resultados são mostrados na tabela a seguir:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| *Chlamydophila pneumoniae* | 1 | 0 | 1 |
| *Legionella pneumophila* | 1 | 0 | 1 |

A especificidade analítica do ensaio foi avaliada usando o material de referência de amostras clínicas que foram testadas como positivas para DNA de *Mycoplasma hominis*. Cada amostra foi usada para realizar o procedimento completo de análise, extração e amplificação com os produtos da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A. Os resultados são mostrados na tabela a seguir:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| Amostras positivas para DNA de *M. Hominis* | 5 | 0 | 5 |

### Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas negativas, foi verificada analisando amostras celulares que foram negativas para DNA de *M. pneumoniae* e o resultado foi de 96.1%

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência amostras clínicas de BAL e BA que eram negativas para DNA de *M. pneumoniae,* testadas usando ensaio de amplificação nested. Cada amostra do painel foi empregada para realizar um procedimento completo de análise, extração e amplificação com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| Negativas para DNA de *M. pneumoniae* | 55 | 2 | 50 |

Duas amostras produziram um resultado positivo conflitante com os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A. Estas amostras foram testadas novamente e produziram um teste positivo. A amostra foi analisada quantitativamente e mostraram uma titulação abaixo de 10 gEq / reação, o que é abaixo do limite de detecção do produto e do sistema de amplificação nested usada para testar as amostras. Amostras podem produzir resultados positivos ao acaso em titulações tão baixas.

Três amostras forneceram resultados inválidos.

### Vigor: efeito da matriz - Controle Positivo

O vigor do ensaio, ou seja, o efeito da matriz que leva a resultados falso negativos, foi testado pela análise um painel de extratos de amostras clinicas positivas para DNA de *M. pneumoniae* a uma alta titulação próxima ao limite de detecção.

O efeito da matriz foi testada usando, como material de referência, amostras de DNA extraídos de BAL e BA negativos para Dna de *M. pneumoniae* (testados usando um ensaio de amplificação nested) e tornados positivos com DNA plasmatico diluido a uma titulação de 30 copias / 5 µL (3 vezes o limite de detecção). Estas amostras foram usadas para realizar a amplificação com produtos Nanogen Advanced tecnologies S.P.A. Os resultados são mostrados na tabela abaixo:

| Amostras | N | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| Extratos tornados positivos para DNA *M. pneumoniae* | 50 | 50 | 0 |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEYRAC B., et al. (1993) *Clin Inf Dis* 17: S83 - S89

## IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

## INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

## REGISTRO ANVISA

80298490072

## RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

## REVISÕES

| Revisão | Descrição da Alteração | Data |
|---|---|---|
| 01 | Revisão geral do texto | 05/2011 |
| 02 | Alteração da razão social do fabricante, revisão do texto do item 10 (resultados), alteração do DDG | 09/2012 |
| 03 | Formatação, alteração de Responsável Técnica | 01/2013 |

# CTR094
# Mycoplasma pn. – Controle Positivo

Instruções de Uso

## USO PRETENDIDO

O produto «*Mycoplasma pn.* – **Controle Positivo** » é destinado ao uso como um controle positivo em ensaios qualitativos de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção do **DNA de *Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae*)** com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « ***Mycoplasma pn*. Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « ***Mycoplasma pn.* Q - PCR Alert AmpliPROBE**» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

## DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **Controle Positivo** fornece uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida dividida em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo teste contém 65 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

O plasmídeo contém a região amplificada do gene que codifica a citoadesina P1 do ***M. pneumoniae.*** A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do DNA do ***M. pneumoniae***.

O kit possibilita a execução de 25 reações de amplificação usando 5 µL por reação.

## MATERIAIS FORNECIDOS

| Componente | Descrição | Quantidade | Composição |
|---|---|---|---|
| **Myco. pn. Controle Positivo** | **Solução de plasmídeo** | **2 x 65µL** | **Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura** |

- Armazenar a -20°C ou inferior.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 – 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

## ACESSÓRIOS

Os reagentes para amplificação e detecção do DNA não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- « ***Mycoplasma pn.*** **Q - PCR Alert AmpliMIX**» (RTS094-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 96 reações.
- « ***Mycoplasma pn.*** **Q - PCR Alert AmpliPROBE**» (RTS094-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 96 reações.

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

### Advertências e precauções gerais

Manuseie e descarte todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evite o contato direto com amostras biológicas. Evite respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Manuseie e descarte todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evite contato direto com reagentes. Evite respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte.

Use jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipete soluções com a boca.

Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos dentro da área de trabalho.

Lave as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descarte as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas

de segurança.

Leia as instruções de uso antes de utilizar o produto. Siga as instruções.

Não use produtos após o prazo de validade estabelecido.

Somente use os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misture reagentes de diferentes lotes.

Não utilize reagentes de outros fabricantes.

## Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transfira materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou serem usadas com ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

## Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Controle Positivo** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes. Um número maior de ciclos de

congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

O **Controle Positivo** apresenta as seguintes advertências (S):

**S 23-25** Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

## PROCEDIMENTO

O produto « ***Mycoplasma pn.*** **- Controle Positivo** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos **«Q - PCR Alert AmpliMASTER»**, **«** ***Mycoplasma pn.*** **Q - CR Alert AmpliMIX»** e **«** ***Mycoplasma pn.*** **Q - PCR Alert AmpliPROBE»**.

O **Controle Positivo** está pronto para o uso, portanto deve ser usado adicionando 5 µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto **«** ***Mycoplasma pn.*** **Q - PCR Alert AmpliMIX»,** bem como informações sobre as características de performance e limitações do procedimento.

**NOTA:** O **Controle Positivo** pode ser congelado e descongelado por no máximo 12 vezes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBEYRAC B., et al. (1993) *Clin Inf Dis* 17: S83 - S89

## IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

## INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

## REGISTRO ANVISA

80298490073

## RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

## REVISÕES

| Revisão | Descrição da Alteração | Data |
|---|---|---|
| 01 | Revisão geral do texto | 05/2011 |
| 02 | Alteração da razão social do fabricante, revisão do texto do item 10 (resultados), alteração do DDG | 09/2012 |
| 03 | Formatação, alteração de Responsável Técnica | 01/2013 |

WORKSHEET

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |